

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
飯 田 征 二 印	全般的な指導
大 原 直 也 印	実験、研究方針、論文作成指導
印	

## 学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野 顎口腔再建外科学	身分 大学院生	氏名 徳善 英紀
論 文 題 名 カイコにおける <i>Mycobacterium ulcerans</i> の感染モデルの検討		
<p><b>【緒言】</b></p> <p>ブルーリ潰瘍は、<i>Mycobacterium ulcerans</i> によって引き起こされる。病原因子として外毒素であるマイコラクトンが知られており、その合成にはプラスミドが関与する。<i>M. ulcerans</i> は遅発育性であり、集落形成に 6~8 週間以上を要する。またマイコラクトンの合成に関与するプラスミドは脱落しやすく、マイコラクトン非産生菌に転換する場合がある。ところで、<i>M. ulcerans</i> 及びマイコラクトンの病原性の評価にはマウスをはじめとする哺乳類が用いられるが、多量の試料と長期の評価期間を要し、また安定した結果を得ることは困難である。使用する試料が少量でよく、かつ短期間で評価を行うことができる方法として昆虫であるカイコを用いた実験系に着目した。カイコは、非獲得性免疫反応を有し、少量の試料で、短期間で評価できることから、様々な病原体の病原性の評価に利用されている。本研究では、<i>M. ulcerans</i> のカイコ感染モデル有用性に着目し、<i>M. ulcerans</i> 及びマイコラクトンの病原性評価への応用可能性を検討した。</p> <p><b>【材料ならびに方法】</b></p> <p>1. 培養条件およびプラスミド pMUM001 保持の確認</p> <p><i>M. ulcerans</i> Agy99 株はアルブミン・デキストロース・カタラーゼ (ADC) 添加 Middlebrook 7H10 (7H10-ADC) 寒天培地および ADC と Tween80 (終濃度 0.05%) を添加した Middlebrook 7H9 (7H9-ADC-Tween80) 液体培地を用いて、30℃ で培養した。<i>M. ulcerans</i> とプラスミド pMUM001 の保持の確認は、<i>M. ulcerans</i> に特異的な挿入配列 <i>IS2404</i> を標的としたプライマーおよび pMUM001 の塩基配列の一部を標的としたプライマーをそれぞれ用いた polymerase chain reaction (PCR) 法により行った。</p> <p>2. <i>M. ulcerans</i> の毒性の評価</p> <p>マイコラクトン産生 <i>M. ulcerans</i> Agy99 株とマイコラクトン非産生 <i>M. ulcerans</i> Agy99 株を、それぞれホモジナイザーを用いて Middlebrook 7H9-ADC-Tween80 液体培地中で均一化した後、菌液の調整を行った。菌液を波長 600nm (OD<sub>600</sub>) で吸光度を測定し、OD=2.0 (約 6.5×10<sup>7</sup> cell/mL)、OD=0.2 (約 6.5×10<sup>6</sup> cell/mL)、および 0.02 (約 6.5×10<sup>5</sup> cell/mL) に調整した。各菌液 50μL を 5 齢 1 日目のカイコに第 6 節より投与した。投与後各群のカイコの生死を 5 日後まで確認した。</p> <p>3. 生菌投与によるカイコの体液および組織の変化</p> <p>前項と同様に <i>M. ulcerans</i> Agy99 株を調整してカイコに投与した。投与 1 日後にカイコを解剖し、体液を回収した。回収した体液の吸光度 (OD<sub>470</sub>) を測定した。また、カイコを解剖して体内の組織変化を肉眼的に観察した。</p>		

## 論文内容の要旨（2000 字程度）

### 4. マイコラクトンの毒性の評価

0.1% Triton X-100 水溶液を用い、精製マイコラクトンを、2 mg/mL、20 mg/mL、および 200 mg/mL の濃度に調整した。各 50 $\mu$ L を 5 齢 1 日目のカイコに投与し、1 日毎に生死を確認した。

### 5. マイコラクトン投与による体液および組織の変化

前項と同様にマイコラクトン溶液 50 $\mu$ L を、5 齢 1 日目のカイコに投与した。投与 6 時間後に、3 に準じて体液を回収し、体液の吸光度（OD<sub>470</sub>）を評価した。また、解剖してカイコ体内の組織変化を確認した。

## 【結果】

1. 7H10-ADC 寒天培地上で *M. ulcerans* を培養したところ、黄色集落と白色集落の形成が認められた。PCR 法の結果より、両者はともに *M. ulcerans* であるが、黄色集落菌は pMUM001 保持菌であり、白色集落菌では pMUM001 非保持菌であることが示唆された。

2. 黄色集落菌投与群では、他の群と比較して生存率の低下が認められた。

3. 黄色集落菌投与群では、菌数に比例した体液の着色および背脈管における強い体液の着色がみとめられ、一部ノジュールの着色も認められた。白色集落菌投与群では体液および背脈管における体液の着色は軽度であった。

4. マイコラクトン 10 $\mu$ g 投与群では、投与 1 日後にすべてのカイコが死亡した。0.1 $\mu$ g 投与群と 0.1% Triton X-100 水溶液投与群では死亡は認められなかった。

5. マイコラクトン投与 6 時間後における体液の着色は、マイコラクトンの濃度に比例して強くなる傾向にあったが、有意差は認められなかった。またいずれの群間でも背脈管の着色は認められなかった。

## 【考察】

黄色集落菌投与群では、白色集落菌投与群に比し、カイコの死亡率が有意に高かったことから、カイコは *M. ulcerans* に感受性を有し、*M. ulcerans* の投与によるカイコの死亡にはマイコラクトンが関与している可能性が示唆された。

黄色集落菌と白色集落菌の体液の着色の違いは、マイコラクトンがカイコの防御反応に影響を与えた結果による可能性が考えられた。

マイコラクトン投与による濃度依存的な死亡率の上昇が認められ、濃度依存的に体液の着色を示す傾向も認められたことから、カイコはマイコラクトンの毒性に感受性を有することが示唆された。一方で、マイコラクトン投与群では、生菌投与群と比較して、解剖時の背脈管の着色は乏しく、ノジュール形成も認められなかったことから、カイコの背脈管および体液の着色は主にマイコラクトン以外の菌体成分によって促進されることが示唆された。

## 【結語】

カイコはマイコラクトン産生性 *M. ulcerans* に対する感受性を有することが認められた。また、マイコラクトンに対する感受性も認められた。これらのことから、*M. ulcerans* およびマイコラクトンの病原性の評価モデルとしてカイコが応用可能であることが示された。